

Ph.D. értekezés tézisei

TRANZIENS RECEPTOR POTENCIÁL VANILLOID 1 (TRPV1) IONCSATORNA VIZSGÁLATA

Winter Zoltán



Szeged
2013



**Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola**

**Gyógyszeranalitika Ph.D program
Programvezető: Prof. Dr. Dombi György**



Gyógyszeranalitikai Intézet

Témavezetők:

Prof. Dr. Dombi György

Dr. Szakonyi Gerda

Dr. Oláh Zoltán

Winter Zoltán

TRANZIENS RECEPTOR POTENCIÁL VANILLOID 1 (TRPV1) IONCSATORNA VIZSGÁLATA

Szigorlati Bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Máthé Imre

Tagok: Dr. Krizbai István

Dr. Martinek Tamás

Bírálni bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Tóth Gábor

Opponensek: Dr. Szegedi Viktor

Prof. Dr. Varga Csaba

Tagok: Prof. Dr. Tóth Géza

Dr. Hajdú Zsuzsanna

1. Bevezetés

A gyógyszeripari kutatások fő célja, olyan támadáspontok azonosítása, amelyek specifikus és hatékony manipulációja lehetőséget nyújt a betegséget vagy fájdalmat okozó folyamatok megszüntetésére. Ehhez azonban a támadáspont - esetünkben a TRPV1 ioncsatorna - alaposabb megismerése nélkülözhetetlen.

A TRPV1 receptor egy nem-szelektív, ligand-függő kationcsatorna, mely kilencszer nagyobb áteresztőképességgel rendelkezik Ca^{2+} , mint Na^+ iránt. A TRPV1 receptor sokféle külső és belső eredetű, fizikai és kémiai inger integrátora, melyek közül legfontosabbak és legismertebbek a kapszaicin (CAPS), a káros hő ($>43^\circ\text{C}$) és a szöveti pH csökkenés ($\text{pH} < 5.2$). A CAPS mellett számos komplex amfifil molekula képes aktiválni vagy gátolni a TRPV1 receptort. Ezek közé olyan, több gyűrűt tartalmazó vegyületek tartoznak, mint például a reziniferatoxin (RTX).

A RTX - egy erősen irritáló forbol-észter-rokon diterpén [1], a leghatásosabb természetes diterpén TRPV1 agonista - különböző Euphorbia fajok (*E. resinifera*, *E. poissoni* és *E. unispina*) [2] tejnedvében található. Biológiai vizsgálatok alapján a RTX 3-4 nagyságrenddel potensebb agonistája a TRPV1-nek mint a CAPS, ezáltal citotoxikus koncentrációjú Ca^{2+} beáramlását idézheti elő a neuronokba, és így a neuronok gyors nekrozisát okozhatja [3-6]. A "molekuláris idegsebészet" során a RTX Ca^{2+} -citotoxikus hatásának a kiaknázását javasolták bizonyos típusú fájdalmak kezelésére. Ilyen módon a RTX segítségével a TRPV1-et expresszáló, fájdalmas ingereket továbbító neuronok specifikusan kiiktathatóak [3, 4, 6]. "RTX az előrehaladott rákos betegség következtében kialakult súlyos fájdalmak kezelésére" megnevezésű ("RTX to treat severe pain associated with advanced cancer") klinikai vizsgálat jelenleg is folyik és fázis II stádiumban tart [7].

Jelenleg is tudományos vita folyik arról, hogy a TRPV1 aktiválható-e [8-10] allil-izotiocianáttal (AITC), a TRPA1 agonistájával, vagy sem [11-13]. Story és munkatársai [12] feltételezték elsőként, hogy bizonyos neuronok AITC-ra adott válaszát a TRPV1-el koexpresszálódó TRPA1, és nem pedig a TRPV1 okozza. Mindaddig azonban nem történt átfogó vizsgálat ennek a hipotézisnek az ellenőrzésére, sem pedig azon funkcionális következmények feltárására, melyeket TRPV1 és TRPA1 csatornák együttes deléciója idéz elő.

A TRPV1 a szervezetben való elhelyezkedésétől függően számos funkciót tölt be, és rendkívül változatos fizikai folyamatokban vesz részt. Kulcsszerepet játszik az akut hő, a CAPS vagy a perifériás szövetek gyulladásos folyamatai okozta égő fájdalomérzet kialakulásában [14, 15]. A perzselő fájdalomérzet kialakítása mellett azonban a TRPV1-nek alapvető szerepe van a húgyúti, a légzőszervi és az auditív rendszerek normális működésének fenntartásában is. Továbbá, a TRPV1 a test és a sejtek homeosztázisának fenntartásában is részt vesz (pl. a testhőmérséklet [16, 17], az anyagcsere, a hajnövekedés szabályozásában [18]), sőt még a rákos megbetegedések kialakulásában is fontos szerepet tulajdonítanak neki. Az emésztő szervrendszerben szintén számos anyagcsere-betegség, köztük a diabétesz, az elhízás és a hasnyálmirigy-gyulladás [19] kialakulásában is kimutatták fontosságát.

Mindezek alapján könnyen belátható, hogy a TRPV1 receptor szerkezetének, működésének, illetve az egészséges szervezetben, valamint a betegségek kialakulásában betöltött szerepének alaposabb megismerésével, lehetőségünk nyílik a TRPV1 működésének befolyásolására és ezáltal új, izgalmas terápiás beavatkozások kifejlesztésére.

2. Célkitűzés

A kutatás egyik célja azon szenzoros modalitások meghatározása, és alaposabb vizsgálata, amelyek újszülött vagy felnőtt egerek RTX kezelését követően megszűnnek, továbbá a "molekuláris idegsebészet" potenciális mellékhatásainak feltárása.

A kutatás másik fő célja, hogy a kétértékű nehézfém kationok TRPV1 ioncsatornára gyakorolt hatásának vizsgálatával és a szakirodalomban fellelhető pontmutációs adatok rendszerezésével a TRPV1 fehérje szerkezetéről és működéséről értékes információkat gyűjtsünk, alapot nyújtva a TRPV1 fehérje további *in silico* modellezéséhez.

Ezen fő célok eléréséhez az alábbi konkrét feladatokat határoztuk meg:

- Az AITC TRPV1-re gyakorolt lehetséges hatásának meghatározása.
- A RTX-kezelt egerek vanilloid-érzékenységének tesztelése, ellenőrizve ezáltal a TRPV1+ neuronok törlésének hatékonyságát.
- A RTX-kezelt egerek AITC-érzékenységének vizsgálata a TRPV1-TRPA1 koexpresszió mértékének meghatározására a szenzoros neuronokban.
- A RTX-kezelt egerek hőérzékenységének tesztelése, a TRPV1 és koexpresszált homológjainak a hőérzékelésben betöltött tényleges szerepének felderítésére.
- A RTX-kezelt vagy kezeletlen egerek hátsó gyöki ganglion (DRG) és trigeminális ganglion (TG) neuronjainak TRPV1, TRPA1 és TRPM8 tartalmának immunhisztokémiai és Western blot analízisek segítségével történő jellemzése.
- Kétértékű nehézfém kationok TRPV1 csatornára kifejtett hatásainak vizsgálata vanilloid-indukált $^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvételi tesztek segítségével.
- A TRPV1-en keresztüli Co^{2+} akkumuláció vizsgálata $(\text{NH}_4)_2\text{S}_x$ hisztokémiai vizsgálatok segítségével.
- A Co^{2+} gátló hatásának *in vivo* tesztekben történő vizsgálata.
- A TRPV1 szakirodalomban elérhető mutációs adatainak összegyűjtése, rendszerezése és olyan formában történő publikálása, amely megkönnyíti a csatorna *in silico* modellezését.

3. Módszerek

RTX kezelés - 1 mg RTX-t 500 μ l 96%-os etanolban feloldva, fiziológiás sóoldattal a végső koncentrációra hígítva körülbelül 100 μ l térfogatban a hím CD/1 egerek tarkó tájékának bőre alá oltottuk. A RTX oltást a szükségtelen fájdalom elkerülése érdekében enyhe éteres altatásban végeztük, 50 μ g/testtömeg kg dózisban. A kontrol egerek vivőanyagot kaptak. Felnőttkori kezelés esetében, a kísérlet kezdetén 30 g körüli súlyú, 2-3 hónapos felnőtt egerek vizsgálata a RTX oltást követő 10. napon, míg a kétnapos korukban kezelt egerek tesztelése két hónapos korukban történt. Krónikus RTX kezelés esetében az állatok oltását 3 egymást követő napon végeztük, naponta egyszeri 20 μ g/testtömeg kg dózis alkalmazásával.

Szemtörlés (Eye wipe) teszt - 100 μ M CAPS-t vagy 100 μ M CAPS-t és 1 mM CoCl_2 -ot vagy 100 μ M CAPS-t és 5 μ M kapszazepint (CapZ) tartalmazó oldatot cseppentettünk CD/1 egerek szemébe és a védekező törlő mozgások számát hasonlítottuk össze.

Hideg érzékelési (Cold tail-flick) teszt - Az egerek farkát, hosszának körülbelül feléig, jéghideg vízbe ($\sim 5^\circ\text{C}$) merítve, a fark kiemelésének vagy elrántásának időpontját figyeltük.

Hideg érzékelési (Cold plate) teszt - Hideg felület létrehozásához mikro-plate termosztátot 5°C -ra állítottuk. Az egereket a lemezre helyezve, a mellső végtag felemelésének idejét rögzítettük.

Meleg érzékelési (Hot plate) teszt - Az állatokat 53°C -ra beállított mikro-plate termosztátra helyezve, a mellső lábak megnyalásának idejét figyeltük.

Vízfogyasztás - Az egyesével elhelyezett egerek napi vízfogyasztását mértük. Minden palack 0,1 mM-os koncentrációjú AITC-os csapvizet tartalmazott.

$^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvétel - C-terminálisan ε -jelölt rTRPV1-et expresszáló HaCaT és Cos7 adherens sejtvonalakat poli-D-lizinnel bevont 96-lyukú, lapos fenekű lemezekre (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgium) oltottunk 20000 sejt/lyuk sejtszámban. A lemezeket szobahőmérsékleten ($20\text{--}25^\circ\text{C}$) háromszor mostuk mosó oldattal (0,8 mM MgCl_2 -dal és

25 mM Tris-HCl-dal, pH = 7,4 kiegészített Ca^{2+} - és Mg^{2+} -mentes HBSS). 1,33 $\mu\text{Ci/ml}$ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -ot (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) is tartalmazó soros hígításokat készítettünk a szükséges reagensekből, majd a sejteket ezekben az oldatokban inkubáltuk tíz percig 24 °C-on, lyukanként 100 μl végtérfogatban. A $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -felvétel leállításához és a szabad izotóp eltávolításához a sejteket háromszor mostuk, majd lizáltuk lyukanként 80 μl lízis pufferrel (50 mM Tris-HCl, pH = 7,5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,1% SDS, 5 mM EDTA) 30 percig rázatva. A szolubilizált sejt extraktumokból 70 μl -t 100 μl Optiphas Supermix szcintillációs koktéllal (Perkin Elmer, Wellesley, MA) összekevertük, majd Perkin Elmer folyadék szcintillációs számlálóval a minta beütésszámát számoltunk. A hőmérséklet hatásának vizsgálatához a TRPV1/HaCaT sejteket hatlyukú lemezekre oltottuk. A $^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvétel elősegítése 10 ml előmelegített pufferrel történt. A kísérletet továbbiakban a fent leírt módon végeztük.

Fehérje extrakció és Western-blot analízis - A szövetminták homogenizálása módosított RIPA-pufferben (50 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 5 mM EDTA-t, 1% Triton X-100, Protease Inhibitor Cocktail - Roche, Mannheim, Németország) történt a sejtfeltárás teljes lezajlásához 15 percig jégen inkubálva. A poliakrilamid gélelektroforézis az Amersham Biosciences Fehérje-Elektroforézis technikai kézikönyve (Buckinghamshire, UK) alapján történt. Fehérje mintákat 8%-os poliakrilamid gélen választottuk el, majd transzferáltuk Millipore Immobilon PVDF membránra Tris-glicin transzfer pufferben (0,192 M glicin, 25 mM Tris-t, 20%-os MetOH). A transzfert követően a membrán szabad helyeinek blokkolása következett (30 perc szobahőmérsékleten, 5% száraz tejpor, TBS-Tweenben), majd az elsődleges antitesttel (4 °C-on, 0,5%-os BSA-TBS-Tweenben) egy éjszakán át inkubáltuk. A másodlagos antitesttel szobahőmérsékleten két órán át (1%-os száraz tejpor TBS-Tween) inkubáltuk a membránt. A blottot ECL módszerrel detektáltuk (SuperSignal West kemilumineszcens szubsztrát (Pierce Biotechnology Inc. Rockford, IL), Hyperfilm ECL - Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). TBS: 50 mM Tris, 140 mM NaCl, pH = 7,6; TBS-Tween: TBS 0,5% Tween-20. Antitestek, valamint alkalmazott hígításaik: TRPV1 - 1:1000 (ABR Bioreagents, PA1-747); TRPA-1 - 1:1000 (Transgenic Inc. Kumamoto, Japán. #KM120); TRPM8 - 1:1000 (Alomone Labs, Jeruzsálem, Izrael

#ACC-049); béta-aktin - 1:1000 (Sigma, St. Louis, MO #A5060), anti-egér és anti-nyúl HRP - 1:10000 (Sigma, St. Louis, MO #A0168 és #A6154).

Kobalt Hisztokémia - A tárgylemezhez rögzített patkány DRG sejteket puffer A-ban (57,5 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM MgCl, 10 mM HEPES, 12 mM glükóz, 139 mM szacharóz, pH = 7,4) 2 percig mostuk, majd 10 percig Co^{2+} -felvételt elősegítő pufferben (puffer A + 5 mM CoCl_2 + 20 uM CAPS) inkubáltuk 37 °C-on. A magas (20 μM) CAPS koncentrációt a robusztus és könnyen kimutatható Co^{2+} szignál elérésének érdekében használtuk. Puffer A-val történő mosást követően, a sejtek által felvett Co^{2+} -ot 0,12%-os ammónium-poliszulfidot (Sigma-Aldrich) tartalmazó puffer A-val kicsaptuk, amelynek eredményeként sötét, vízben oldhatatlan CoS csapadék vált ki a TRPV1+ sejtekben. A sejteket 4%-os paraformaldehiddel fixáltuk, üveg tárgylemezre rögzítettük és Kaiser-féle glicerín-zselatinnal (Merck, Darmstadt, FRG) fedtük le.

Immunhisztokémia - Túlaltatott egereket intrakardiálisan perfundáltuk 4% paraformaldehidet tartalmazó 0,1 M nátrium-foszfát-pufferben (PB, pH = 7,4). A TG-okat a kimetszésüket, és 30%-os szacharóz oldatban egy éjszakán át 4 °C-on történő krioprotekciójukat követően Tissue Tek OCT (Sakura Finetek, Torrance, CA) beágyazóval ágyasztuk be és szárazjéggel fagyasztottuk. A fagyasztott metszeteket a Shandon Cryotome Fe (Thermo Fisher Middletown, VA) mikrotómmal metszettük és SuperFrost tárgylemezeken -20 °C-on tároltuk felhasználásig. A metszeteket blokkoló oldatban (5%-os kecske szérum, 0,1% Triton-X-PBS-ben pH = 7,4) előinkubáltuk. Ezután a metszeteket primer antitesttel inkubáltuk 4 °C-on 24 órán át, majd másodlagos antitesttel 2-6 órán át. Antitestek, valamint azok hígításai: TRPV1 1:50 (monoklonális antitest közvetlenül Alexa Fluor 488-al jelölve), TRPA1 1:50 (nyúl poliklonális, Transgenic Inc. Kumamoto, Japán. # KM120) anti TRPM8 1:50 (nyúl poliklonális, Alomone Labs, Jeruzsálem, Izrael # ACC-049) anti-nyúl IgG-TRITC 1:400 (Sigma, St. Louis, MO). Metszeteket szabványos üveg tárgylemezre rögzítettük és Dako Faramount Aqueous Mounting Mediummal (Dako, Glostrup, Dánia) fedtük le.

Minden állatkísérlet az intézményi felülvizsgálati bizottság által, illetve az illetékes kormányzati hivatal által jóváhagyott módon történt.

4. Eredmények és értékelésük

A kutatás eredményei a következőkben foglalhatók össze:

1,

- Az AITC TRPV1 csatornára gyakorolt potenciális hatását sejtalapú funkcionális vizsgálatok segítségével, TRPV1-et expresszáló de TRPA1-et nem tartalmazó sejtvonalakon határoztuk meg. Megállapítottuk, hogy az AITC nem aktiválja a TRPV1-et, mivel nem idézi elő Ca^{2+} beáramlását a TRPV1-et expresszáló sejtekbe 125 nM és 2,5 mM közötti koncentrációkban alkalmazva sem.

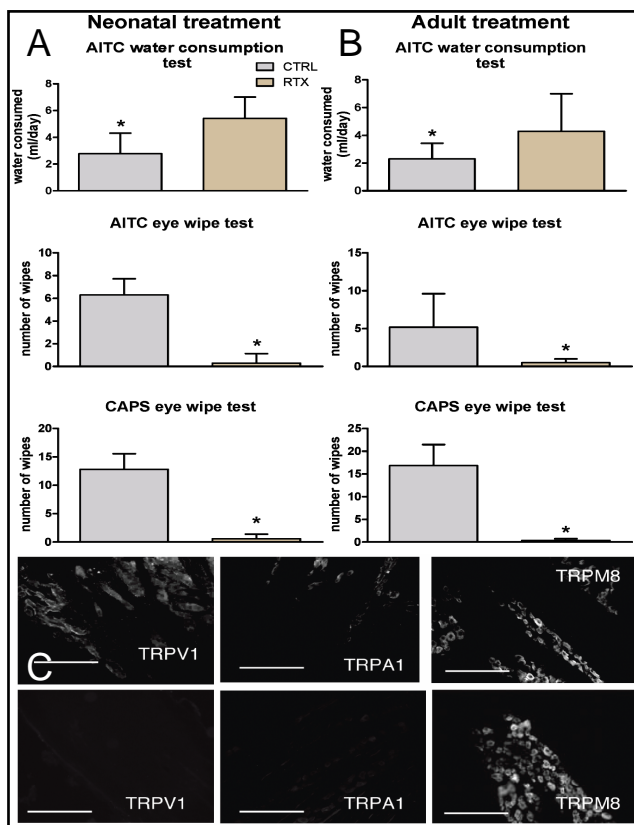
2,

- A RTX-kezelt egerek teljesen elveszítik vanilloid és AITC iránti érzékenységüket szemtörlési vagy AITC tartalmú ivóvízfogyasztási tesztekben vizsgálva, függetlenül attól,

hogy a kezelést egyetlen alkalommal, a születésüket követő második napon, vagy egyetlen alkalommal felnőttkorukban, vagy pedig három alkalommal, három egymást követő napon, felnőttkorukban kapták (1A-B ábra).

- Immunhisztológiai festések és Western blot analízisek igazolták a TRPV1 és TRPA1 fehérje majdnem teljes eltűnését a kezelt egerek DRG-jaiban és TG-jaiban mindhárom típusú RTX-kezelés esetében (1C ábra).

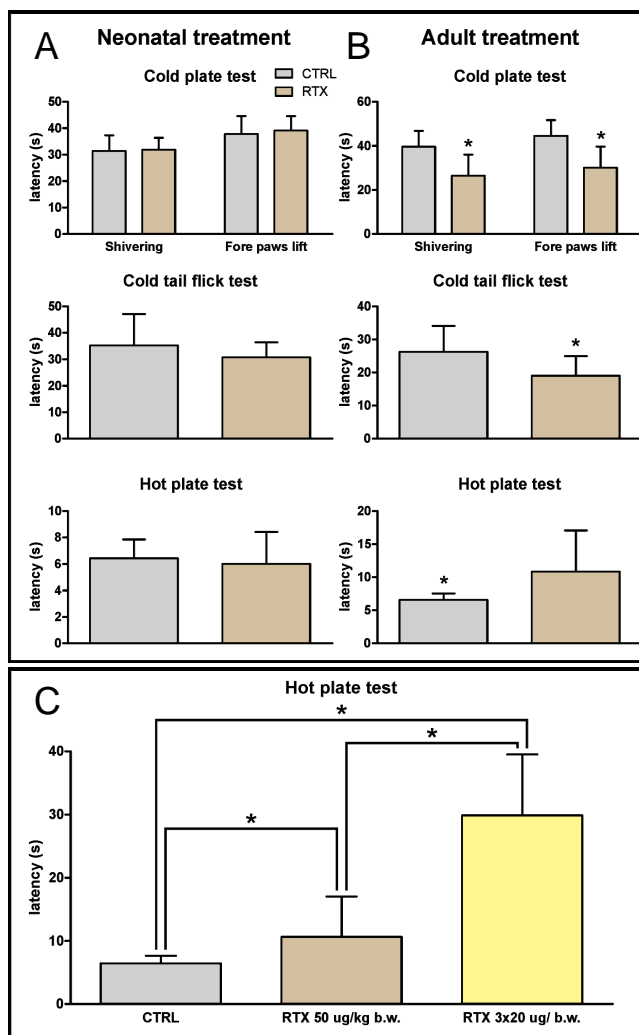
- Ezek az adatok azt mutatják, hogy a TRPA1 expressziója a nociceptív neuronok túlnyomó többségének esetében egybeesik TRPV1 expressziójával.



1. ábra: Újszülött- vagy felnőttkorban RTX-kezelt egerek kémiai érzékenységének megváltozása, és a RTX-kezelés hatása a trigeminális ganglion neuronokra.

3,

- A két nappal a születésük után RTX kezelt egerek - melyek tesztelése két hónapos korukban történt - érdekes módon nem mutattak változást sem a meleg-, sem a hidegérzékelésükben a különböző hőérzékelési tesztek során (2A ábra). Valószínűleg a neuronális plaszticitás jelenségének következtében, az újszülöttkorban kezelt egerek valamilyen módon képesek kompenzálni a C-típusú afferensek kiesése okozta hőérzékelés egyensúlyának felborulását.
- A felnőttkorban, egyszeri RTX dózissal kezelt egerek érzékenyebbé váltak a meleg, és meglepő módon, érzékenyebbé a hideg iránt (2B ábra). Két hipotézist tehetünk ezen megfigyelések magyarázatára: 1, A TRPV1 pozitív neuronok kiesése okozta, NGF által közvetített TRPM8 túltermelés. Azonban nem észleltük a TRPM8 csatorna overexpresszióját a RTX-kezelt egerekben sem Western blot, sem RT-PCR tesztekben. 2, A TRPV1 pozitív neuronok kiesése okozta egyensúly-eltolódás a meleg és a



2. ábra: Újszülött- vagy felnőttkorban RTX-kezelt egerek hő iránti érzékenységeinek megváltozása

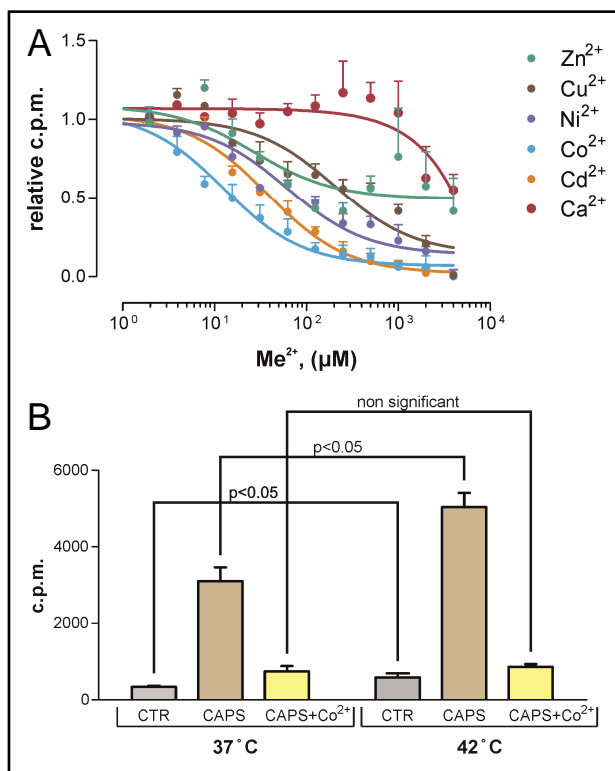
- A felnőttkorukban, három egymást követő napon, kezelt egerek nagyobb mértékben veszítették el a hő iránti érzékenységet, mint az akut kezeléssel átesett egerek (2C ábra), mivel a hőérzékelés küszöbértékének növekedése függ a RTX-kezelés hatékonyságától. Az állat magas hőmérséklet érzékelésének csökkenése sokkal határozottabb, ha a RTX-kezelés szinte az összes TRPV1+ nociceptort kiiktatja.

A krónikus, ismételt RTX-kezelés bizonyult leghatékonyabbnak, míg az újszülöttkori kezelések kevésbé voltak hatékonyak.

- Immunhisztológiai festésekkel és Western-blot kísérletekkel bizonyítottuk, hogy a TRPM8⁺ sejtek érintetlenül megmaradtak a RTX-kezelt egerek DRG-jaiban és TG-jaiban mindhárom kezelés esetén (1. ábra).
- Ezen adatok alapján, a hideg-érzékeny neuronok két, markánsan elkülönülő populációját lehet megkülönböztetni: 1. TRPM8⁺ neuronok, amelyek nem expresszálnak TRPV1-et és TRPA1-et, valamint ellenállnak a RTX kezelésnek. 2. TRPA1⁺ neuronok, melyek TRPV1-et is expresszálnak, és ezek akár AITC-tal vagy RTX-nal is kiiktathatóak.
- Ezek a kísérleti adatok előrevetítik az emberi alkalmazás során a hőérzékelésben fellépő eltolódás lehetőségét, a jelenleg folyó, súlyos daganatos fájdalmak kezelésére irányuló klinikai kipróbálás során. Hasonló változások várhatóak a reverzibilis, specifikus TRPV1 gátló szerek alkalmazása során, melyek fejlesztése különböző gyógyszeripari cégeknél jelenleg is folyik. Mindazonáltal, a RTX klinikai vizsgálata hamarosan választ nyújthat erre a kérdésre a páciensek hidegérzékelésében beálló potenciális változások nyomon követésével, amennyiben emberben történik ilyen változás.

4,

- A Mg^{2+} , a Mn^{2+} vagy a La^{3+} nem változtatta meg szignifikánsan a TRPV1 működését

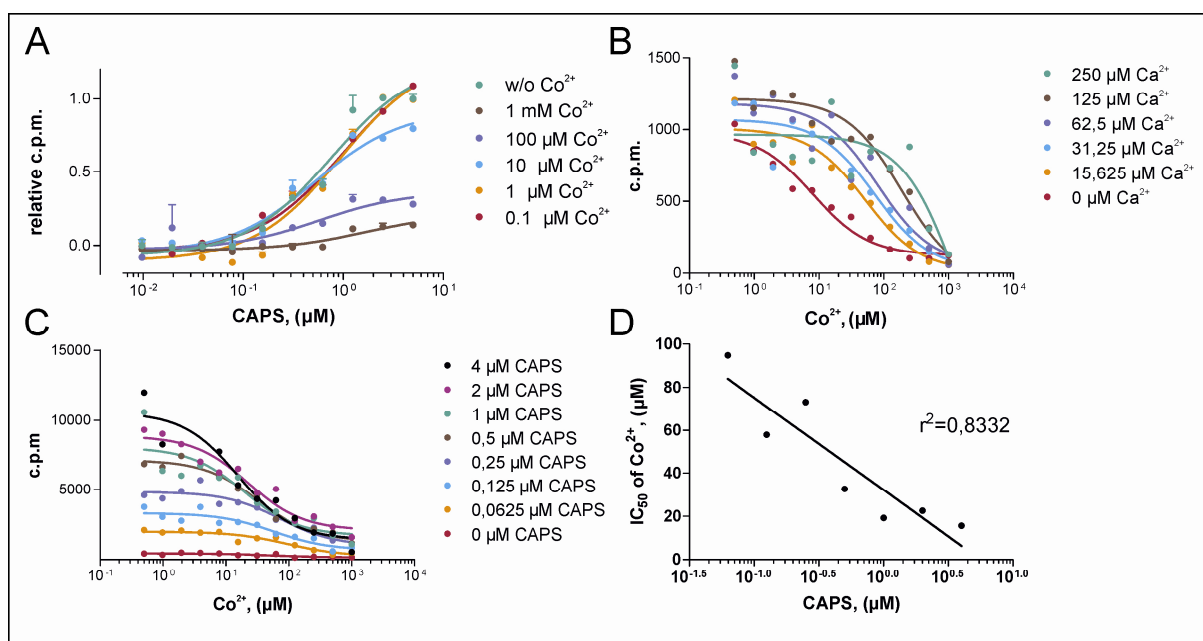


3. ábra: Kéttértékű kationok CAPS és hő által aktivált TRPV1-re kifejtett gátló hatásának vizsgálata

(3. ábra).

- A Zn^{2+} a CAPS által indukált $^{45}Ca^{2+}$ -felvétel gyenge és csupán részleges gátlószerének bizonyult (3A. ábra).
- A Co^{2+} , a Cd^{2+} , a Ni^{2+} és a Cu^{2+} hatékonyan blokkolta a vanilloid-indukált Ca^{2+} -beáramlását a TRPV1/HaCaT sejtekbe a potensségük következő sorrendjében: $Co^{2+} > Cd^{2+} > Ni^{2+} > Cu^{2+}$ (3A. ábra).
- Co^{2+} csökkentette mind a hő-, mind a CAPS-indukálta $^{45}Ca^{2+}$ beáramlást (3B ábra), ruthenium redhez (RuRed), amitriptilinhez (AMI) vagy R_4W_2 -hoz hasonló mértékben.

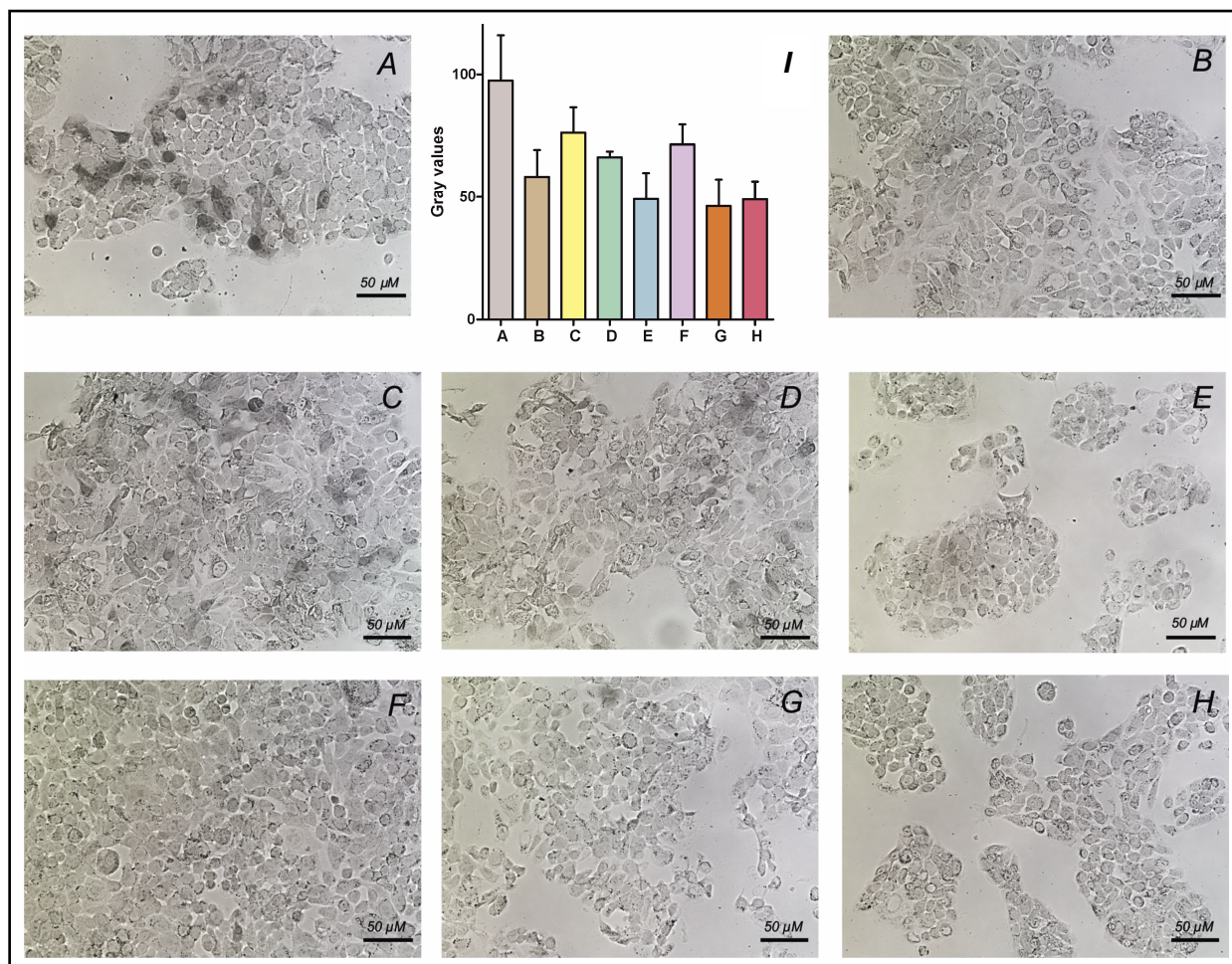
- A Co^{2+} egyre növekvő koncentrációja csak a Ca^{2+} bejutás maximumát (E_{\max}) csökkentette, míg a CAPS affinitását a TRPV1-hez nem változtatta meg vanilloid indukálta $^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvételi tesztben. A Co^{2+} gátlás csatornablokkoló kinetikát mutat (4A ábra).
- A hideg Ca^{2+} koncentráció növelése a vanilloid indukálta $^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvételi tesztben csökkentette a Co^{2+} gátló hatását, tehát a Co^{2+} Ca^{2+} beáramlásra gyakorolt hatása elsősorban a közöttük - a bekötődési helyekért - fellépő versengéstől függ (4B ábra).



4. ábra: Co^{2+} gátlás kinetikájának vizsgálata

- A növekvő CAPS koncentráció a vanilloid indukálta $^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvételi tesztben a Co^{2+} IC_{50} értékének eltolódását okozta, a növekvő agonista koncentráció tehát növeli a Co^{2+} blokkoló képességét (4C ábra). Görbe illesztés megerősítette, hogy szoros kapcsolat áll fenn a Co^{2+} IC_{50} értéke és az alkalmazott CAPS dózisok között (4D ábra), amely arra utal, hogy a gátlás hatékonyságának növekedése korrelál a TRPV1 csatorna különböző nyitott konformációs állapotaival.
- Feltételezzük, hogy a nehézfémek TRPV1 blokkoló hatásának erősségét a fém ionok ionsugarának és a különböző aminosavakkal képzett komplexük stabilitásioefficiens értékeinek együttes hatása határozza meg. Valószínűleg a Ca^{2+} -nak ideális az ionsugara és a stabilitásioefficiens értéke ahhoz, hogy hatékonyan továbbítódhasson az ionszelektivitási filteren és a póruson keresztül a peptid gerinc karbonilcsoportjaival

kapcsolatba lépve. Minél erősebb a fémion-aminosav komplex és minél kisebb az ionsugár, annál valószínűbb, hogy az adott nehézfém ion blokkolja a Ca^{2+} beáramlását a sejtbe a TRPV1 csatornán keresztül.



5. ábra: Co^{2+} hisztokémia rTRPV1/HaCaT sejteken

A sejtek 10 percen át inkubálódtak A pufferben kiegészítve:

A - 20 μM CAPS + 5mM Co^{2+} ;

B - 5mM Co^{2+} CAPS nélkül;

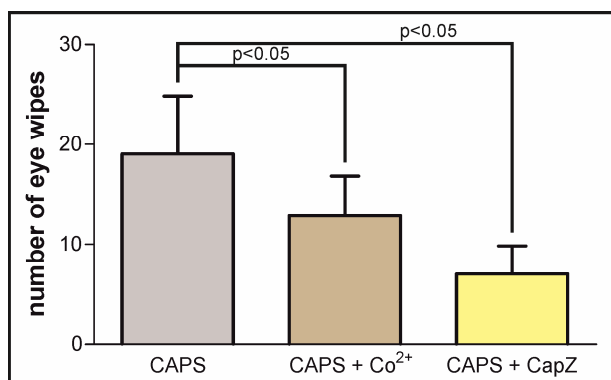
C - 20 μM CAPS + 5mM Co^{2+} + 300 nM CapZ; D - 20 μM CAPS + 5mM Co^{2+} + 5 μM CapZ;

E - 20 μM CAPS + 5mM Co^{2+} + 100 μM CapZ;

F 20 μM CAPS + 5mM Co^{2+} + 500 nM RuRed; G - 20 μM CAPS + 5mM Co^{2+} + 7 μM RuRed;

H - 20 μM CAPS + 5mM Co^{2+} + 100 μM RuRed.

- A rTRPV1/HaCaT, rTRPV1/3T3 sejtvonalakon és patkány embriók DRG-jaiból nyert szenzoros neuron kultúrákon végzett $(\text{NH}_4)_2\text{S}_x$ hisztokémia kísérletek bebizonyították, hogy a Co^{2+} nemcsak kompetál a Ca^{2+} -nal, hanem be is jut a TRPV1+ sejtek citoszoljába a TRPV1 ioncsatornán keresztül (5. ábra).



6. ábra: Co²⁺ hatásának vizsgálata szemtörölés tesztekben

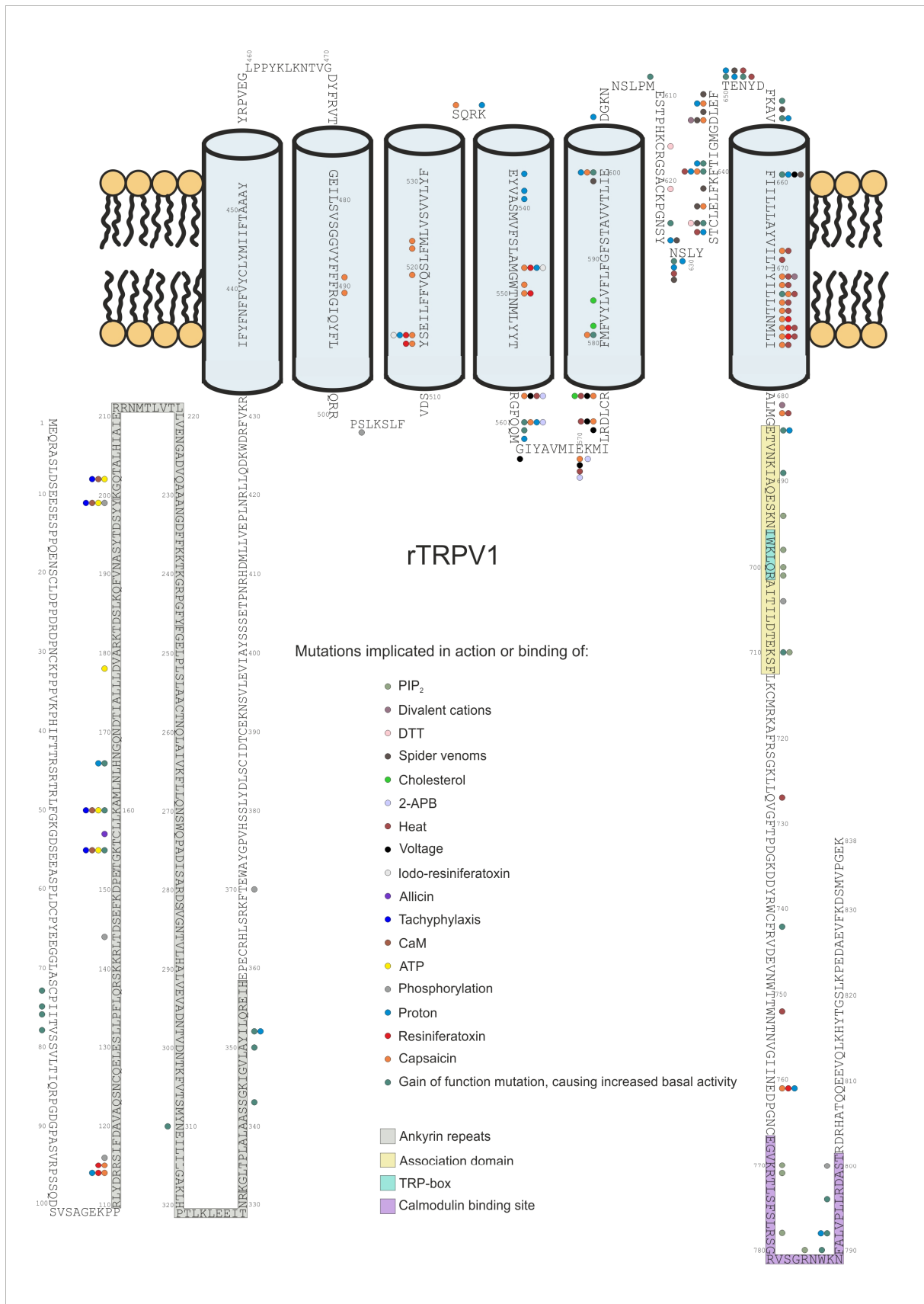
- A rTRPV1/3T3 sejtek extracelluláris KCl-dal való inkubációját követő (NH₄)_nS_x hisztokémiai kísérlet kizárta a feszültségfüggő Ca²⁺ csatornák szerepét a Co²⁺ akkumulációban.
- A Co²⁺ csökkentette a vanilloidok által kiváltott védekező szemtörölő mozgások frekvenciáját *in vivo* szemtörölés tesztekben is (6. ábra).

- A Ca²⁺ és egyéb nehézfém ionok

kötődési helyekért folytatott kompetíciójának, valamint a jelenség strukturális hátterének és dinamikájának a pontosabb megértése új, csatornablokkoló hatáson alapuló fájdalomcsillapítók felfedezéséhez vezethet. A Co²⁺-közvetített gátlás mechanizmusának megismerése lehetővé teheti hatóanyagok hatékonyabb screenelését és olyan adjuváns terapeutikumok felfedezését, amelyek szelektivitása nagyobb, mint az AMI-é, egy engedélyezett, jelenleg is a klinikai gyakorlatban használt, de csak korlátozott hatásossággal és a súlyos mellékhatásokkal bíró gyógyszeré.

5,

- A TRPV1 ioncsatornáról jelenleg a szakirodalomban elérhető mutációs adatok összegyűjtése és publikálása is megtörtént, áttekintést nyújtva 112 egyedi mutációs hely adatairól [20]. Ezen aminosav cserék befolyásolják a különböző agonisták, antagonisták és csatorna blokkolók hatását vagy kötődését, megváltoztatják a csatorna válaszadó képességét a hő, a savasság és a feszültség iránt, befolyásolják a csatorna pórus karakterisztikáját, és befolyásolják a receptor funkció foszforiláció, glikozilezés, kalmodulin, PIP2, ATP és lipid kötődés általi szabályozását (7. ábra).



7. ábra: A TRPV1 működésének megváltozását okozó mutációk

5. Összefoglalás, következtetések

Kimutattuk, hogy:

1.

- a TRPV1 nem funkcionális receptora AITC-nek, mivel az AITC nem okoz Ca^{2+} beáramlást a TRPV1-et expresszáló sejtekbe a $^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvételi teszt során.

2.

- a RTX kezelés sikeresen elpusztítja a TRPV1+ neuronokat mind a felnőtt, mind az újszülött korban kezelt egerekben.
- a nociceptív neuronok túlnyomó többségében a TRPA1 koexpresszálódik TRPV1-el, mivel a RTX kezelés a TRPV1+ neuronokkal együtt TRPA1+ neuronokat is eltávolítja.
- a RTX kezelés megváltoztatja a meleg- és hidegérzékelést a felnőttkorukban kezelt egerekben, de nem módosítja e modalitást az újszülött korukban kezelt egyedek esetében.
- a fenti kísérleti eredmények alapján a humán hőérzékelésben is valószínűsíthető eltolódás RTX injekció hatására.

3.

- a Mg^{2+} , a Mn^{2+} vagy a La^{3+} nem változtatja meg szignifikánsan a TRPV1 működését, míg a Zn^{2+} a CAPS által indukált $^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvétel gyenge és csupán részleges gátlószere.
- a Co^{2+} , a Cd^{2+} , a Ni^{2+} és a Cu^{2+} hatékonyan blokkolja a vanilloid-indukált Ca^{2+} -beáramlását a TRPV1/HaCaT sejtekbe a potensségük következő sorrendjében: $\text{Co}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Cu}^{2+}$.

4.

- a Co^{2+} - a RuRed-hez, az AMI-hez vagy R_4W_2 -hoz hasonló mértékben - csökkenti mind a hő- mind a CAPS-indukált $^{45}\text{Ca}^{2+}$ beáramlást; illetve a TRPV1 csatornán keresztül be is jut a TRPV1+ sejtek citoszoljába.
- a Co^{2+} gátlás csatorna blokkoló kinetikát mutat.
- a Co^{2+} gátló hatása a Ca^{2+} beáramlásra elsősorban a közöttük, a bekötődési helyekért, fellépő versengéstől függ, valamint összefüggést mutat a TRPV1 csatorna különböző nyitott állapotú konformációival.

- a nehézfémek TRPV1 blokkoló hatásának erősségét a fém ionok ionsugarának és a különböző aminosavakkal képzett komplexük stabilitási koefficiens értékeinek együttes hatása határozza meg.

A TRPV1 ioncsatornáról jelenleg a szakirodalomban elérhető mutációs adatok összegyűjtése és publikálása során 112 egyedi mutációs hely adatait dolgoztuk fel [20].

A kísérleteink hatékonyan hozzájárulnak a TRPV1 csatorna élettani szerepének mind pontosabb megértéséhez, valamint lehetőséget teremthetnek a TRPV1 mellett más TRP szupercsaládtagok szerkezetének alaposabb tisztázásához. A kiválasztott kétértékű kation adott ioncsatorna pórus régiójára kifejtett specifikus hatása egy értékes határfeltételként szerepelhet a pórusrégió *in silico* modellezése során. A különböző kationok különböző csatornák pórusrégióira gyakorolt eltérő hatásainak összehasonlítása révén lehetőség nyílik a modellek finomhangolása, illetve a csatornák működésében mutatkozó különbségek okainak feltárására. A TRPV1 szerkezetének, működésének megismerése révén új, ígéretes, hatékonyabb és biztonságosabb gyógyszerek fejleszthetők ki, biztosítva ezáltal a neurogén gyulladások és a fájdalommal járó megbetegedések hathatósabb terápiáját.

6. Referenciák

1. Szallasi A, Blumberg PM: **Resiniferatoxin, a phorbol-related diterpene, acts as an ultrapotent analog of capsaicin, the irritant constituent in red pepper.** *Neuroscience* 1989, **30**:515-520.
2. Hergenhahn M, Kusumoto S, Hecker E: **On the active principles of the spurge family (Euphorbiaceae). V. Extremely skin-irritant and moderately tumor-promoting diterpene esters from Euphorbia resinifera Berg.** *J Cancer Res Clin Oncol* 1984, **108**:98-109.
3. Karai L, Brown DC, Mannes AJ, Connelly ST, Brown J, Gandal M, Wellisch OM, Neubert JK, Olah Z, Iadarola MJ: **Deletion of vanilloid receptor 1-expressing primary afferent neurons for pain control.** *J Clin Invest* 2004, **113**:1344-1352.
4. Olah Z, Szabo T, Karai L, Hough C, Fields RD, Caudle RM, Blumberg PM, Iadarola MJ: **Ligand-induced dynamic membrane changes and cell deletion conferred by vanilloid receptor 1.** *J Biol Chem* 2001, **276**:11021-11030.
5. Szabo T, Olah Z, Iadarola MJ, Blumberg PM: **Epidural resiniferatoxin induced prolonged regional analgesia to pain.** *Brain Res* 1999, **840**:92-98.
6. Zhou HY, Zhang HM, Chen SR, Pan HL: **Increased nociceptive input rapidly modulates spinal GABAergic transmission through endogenously released glutamate.** *J Neurophysiol* 2007, **97**:871-882.
7. **Resiniferatoxin to Treat Severe Pain Associated With Advanced Cancer** [<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00804154?term=resiniferatoxin&rank=1>]
8. Everaerts W, Gees M, Alpizar YA, Farre R, Leten C, Apetrei A, Dewachter I, van Leuven F, Vennekens R, De Ridder D, et al: **The capsaicin receptor TRPV1 is a crucial mediator of the noxious effects of mustard oil.** *Curr Biol* 2011, **21**:316-321.
9. Mori N, Kawabata F, Matsumura S, Hosokawa H, Kobayashi S, Inoue K, Fushiki T: **Intragastric administration of allyl isothiocyanate increases carbohydrate oxidation via TRPV1 but not TRPA1 in mice.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2011, **300**:R1494-1505.
10. Ohta T, Imagawa T, Ito S: **Novel agonistic action of mustard oil on recombinant and endogenous porcine transient receptor potential V1 (pTRPV1) channels.** *Biochem Pharmacol* 2007, **73**:1646-1656.
11. Bandell M, Story GM, Hwang SW, Viswanath V, Eid SR, Petrus MJ, Earley TJ, Patapoutian A: **Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin.** *Neuron* 2004, **41**:849-857.
12. Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW, et al: **ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures.** *Cell* 2003, **112**:819-829.
13. Bautista DM, Movahed P, Hinman A, Axelsson HE, Sterner O, Hogestatt ED, Julius D, Jordt SE, Zygmunt PM: **Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**:12248-12252.
14. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D: **The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway.** *Nature* 1997, **389**:816-824.

15. Jung J, Shin JS, Lee SY, Hwang SW, Koo J, Cho H, Oh U: **Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II regulates its vanilloid binding.** *J Biol Chem* 2004, **279**:7048-7054.
16. Caterina MJ: **Transient receptor potential ion channels as participants in thermosensation and thermoregulation.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007, **292**:R64-76.
17. Gavva NR: **Body-temperature maintenance as the predominant function of the vanilloid receptor TRPV1.** *Trends Pharmacol Sci* 2008, **29**:550-557.
18. Bodo E, Biro T, Telek A, Czifra G, Griger Z, Toth BI, Mescalchin A, Ito T, Bettermann A, Kovacs L, Paus R: **A hot new twist to hair biology: involvement of vanilloid receptor-1 (VR1/TRPV1) signaling in human hair growth control.** *Am J Pathol* 2005, **166**:985-998.
19. White JP, Urban L, Nagy I: **TRPV1 function in health and disease.** *Curr Pharm Biotechnol* 2011, **12**:130-144.
20. Winter Z, Buhala A, Ötvös F, Jósavay K, Vizler C, Dombi G, Szakonyi G, Oláh Z: **Functionally important amino acid residues in the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) ion channel -- an overview of the current mutational data.** *Mol Pain* 2013, **9**:30.

7. Publikációk

- I. Pecze L, Pelsoczi P, Kecskés M, **Winter Z**, Papp A, Kaszás K, Letoha T, Vizler C, Oláh Z, Resiniferatoxin mediated ablation of TRPV1⁺ neurons removes TRPA1 as well, *Can J Neurol Sci.* 2009 Mar;**36**(2):234-41. (IF: 1.041)
- II. Pecze L, **Winter Z**, Jósavay K, Ötvös F, Kolozsi C, Vizler C, Budai D, Letoha T, Dombi G, Szakonyi G, Oláh Z., Divalent heavy metal cations block the TRPV1 Ca(2⁺) channel, *Biol Trace Elem Res.* 2013 Mar;**151**(3):451-61. doi: 10.1007/s12011-012-9570-y. (IF: 1.923)
- III. **Winter Z**, Buhala A, Ötvös F, Jósavay K, Vizler C, Dombi G, Szakonyi G, Oláh Z, Functionally important amino acid residues in the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) ion channel – an overview of the current mutational data, *Mol Pain.* 2013 Jun **22**;9(1):30. (IF: 3.526)

8. Előadások és poszterek

- I. **Winter Z**, Jósvey K, A TRPV1 csatorna szerkezetének vizsgálata, 41. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2011. május (poszter).
- II. **Winter Z**, Pecze L, Ötvös F, Jósvey K, Budai D, Vizler C, Letoha T, Szakonyi G, Dombi G, Oláh Z, Heavy metals especially cobalt inhibit TRPV1 channel, 3rd International Student Medical Congress in Košice, Kassa, 2011. június (előadás).
- III. **Winter Z**, Nehézfém ionok hatása a TRPV1 ioncsatornára, X. Clauder Ottó Emlékverseny, Budapest, 2011. október (előadás).
- IV. **Winter Z**, Nehézfémek hatása a vanilloid receptor működésére, Életfolyamatok és szabályozásuk tudományos konferencia, Szeged, 2011. november (előadás).
- V. **Winter Z**, Pecze L, Ötvös F, Jósvey K, Kolozsi C, Budai D, Vizler C, Letoha T, Dombi G, Szakonyi G, Oláh Z, TRPV1 ioncsatorna vizsgálata nehézfém ionok jelenlétében, 42. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2012. május (poszter).
- VI. Kolozsi C, **Winter Z**, Kusz E, Jósvey K, Vizler C, Dombi G, Oláh Z, Szakonyi G, A tranziens receptor potenciál vanilloid-1 (TRPV1) receptor szerepe a B16 melanóma növekedésében, 42. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2012. május (poszter).
- VII. Buhala A, Jósvey K, **Winter Z**, Dombi G, Oláh Z, Szakonyi G, A humán TRPV1 receptor szerkezetének vizsgálata, 42. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2012. május (poszter).
- VIII. **Winter Z**, Buhala A, Kalmár É, Structural analysis of human TRPV1 channel, 4th International Student Medical Congress in Košice, Kassa, 2012. június (előadás).
- IX. Buhala A, Jósvey K, **Winter Z**, Pecze L, Kalmár É, Dombi G, Oláh Z, Szakonyi G, Structural analysis of the human TRPV1 channel, Hungarian Molecular Life Sciences, Siófok, 2013. április (poszter).